

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

*As rescanning documents **will not** correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.*

hydrogen dextran 200

FREMLÆGGELSESSKRIFT 117730

DANMARK

Int. Cl. A 61 k 27/06
C 07 f 15/02

Kl. 30h 2/02
12o 26/03



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

Ansøgning nr. 1219/60 Indleveret den 30. mar. 1960

Løbedag 30. mar. 1960

Ansøgningen fremlagt og
fremlaggelsesskriftet offentligjort den

25. maj 1970

Prioritet begæret fra den 16. apr. 1959 nr.
806.791 og 25. jun. 1959 nr.
822.744, USA.

Indslgelsesfrist:

25/8.70

CHEMICALS INCORPORATED, Luquillo, Puerto Rico.

Opfinder: Nicolas Anthony Floramo, 901 Jackson Street, Easton, Pennsylvania, USA.

Fuldmægtig under sagens behandling:
Th. Ostenfeld Patentbureau A/S.

Fremgangsmåde til fremstilling af et stabilt, i det væsentlige ikke-ionisk, colloidt, ferrihydroxidkompleks af hydrogeneret dextran.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af et hidtil ukendt stabilt, i det væsentlige ikke-ionisk, colloidt, ferrihydroxidkompleks af hydrogeneret dextran, der kan anvendes til parenterale injektionsformål ved behandling af jernmangel-anæmi.

Der har tidligere været anvendt mange forskellige præparater til parenteral injektion ved behandling af jernmangel-anæmi. Disse præparater har almindeligvis omfattet såkaldte saccharerede jernoxider,

og i den seneste tid colloide, ferrihydroxid-dextrankompleksforbindelser.

Saccharerede jernoxider fremkalder imidlertid stærke smerter og bevirker inflammationer på injektionsstedet, selv når der indgives subterapeutiske doser. Endvidere absorberes sådanne præparater temmelig langsomt, når de injiceres intramuskulært.

Som følge heraf har i de senere år de colloide ferrihydroxid-dextrankompleksforbindelser opnået en væsentlig succes og har i stor udstrækning erstattet saccharerede jernoxider ved behandling af jernmangel-anæmi. Imidlertid har erfaringerne med colloide ferrihydroxid-dextrankomplekser vist, at disse har en vis tendens til at fremkalde bivirkninger ved injektion.

Endvidere har erfaringerne ved fremstillingen af ferrihydroxiddextrankomplekserne vist, at disse vanskeligt kan steriliseres som følge af udtalte forandringer i slutproduktet efter autoklavering. Disse udtalte forandringer omfatter ændringer i pH-værdien, farveændringer og variationer i den kliniske virkning.

Det er den foreliggende opfindelses formål at afhjælpe disse ulemper ved at angive en fremgangsmåde til fremstilling af et stabilt i det væsentlige ikke-ionisk, colloidt, ferrihydroxidkompleks af hydrogeneret dextran med væsentlig ringere tendens til at bevirke uønskede kliniske bivirkninger end de tidlige kendte tilsvarende forbindelser, og som ydermere har samme kliniske nyttevirkning ved behandling af jernmangel-anæmi.

Der opnås endvidere ved anvendelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen, at den fremstillede forbindelse er lettere at sterilisere end ferrihydroxid-dextrankomplekserne, samtidig med at den er mindre tilbøjelig til at undergå ændringer ved autoklavering.

Andre formål for og fordele ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen vil fremgå af nedenstående beskrivelse.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved, at en hydrogeneret dextran med en molekulvægt på mellem 2000 og 10.000 og et grænseviskositetsstal på mellem 0,03 og 0,08, og som er fremkommet ved hydrogenering af fraktioner af syntetisk dextran, frembragt ved polymerisation af saccharose eller ved delvis depolymerisation af en mere højpolymer dextran, og som i det væsentlige ikke er reducerende over for Somogyi's. reagens, i nærværelse af vand bringes til at reagere med ferrihydroxid.

Eventuelt kan ifølge opfindelsen det ved omsætningen anvendte ferrihydroxid dannes in situ ved omsætning mellem et ioniserbart ferrisalt og en alkalisk forbindelse; dette har i praksis vist sig at være den mest økonomiske måde at udføre omsætningen på.

Hensigtsmæssigt sker dannelsen in situ af ferrihydroxidet ved tryk over atmosfæretryk og ved forhøjet temperatur.

Den delvis depolymeriserede højpolymere dextran, der anvendes som udgangsmateriale ved fremstillingen af den syntetiske dextran, der skal hydrogeneres, stammer fra rådextran, der fås ved anvendelse af kendte fremgangsmåder ved vækst under omhyggeligt regulerede temperaturbetingelser af egnede organismer, særlig *Leuconostoc mesenteroides*, syn. *Betacoccus arabinosaceous* i et passende næringssubstrat indeholdende en stor procentdel saccharose. Det er endvidere kendt, at højpolymer rådextran kan undergå delvis nedbrydning; således f. eks. ved behandling med fortyndede mineralske syrer, til simplere polymerformer, idet der ud fra vandige, polydisperse opløsninger heraf vil kunne bundfældes fraktioner med forskellig gennemsnitsmolekulvægt ved tilsætning af en passende med vand blandbar, organisk væske, såsom methylalkohol, ethylalkohol eller acetone. Disse nedbrydningsprodukter består af polysaccharider opbygget af glucose-rester i overvejende grad forbundne ved α -1:6 og i mindre grad ved α -1:4 bindinger.

Den til fremstilling af den hydrogenerede dextran anvendte syntetiske dextran kan endvidere fremstilles ved polymerisation af saccharose, hvilket f. eks. er beskrevet af Anders Grönwall i "Dextran and its use in colloidal infusion solutions", Academic Press Inc., 1957, pagina 22-25 og 29-31.

En fraktion af den ovenfor anførte art af syntetisk dextran er egnet som udgangsmateriale ved fremstillingen af den hydrogenerede dextran, idet molekulvægtsområdet for den delvis polymeriserede dextran vælges ud fra fysiske karakteristika, såsom grænseviskositetstallet af opløsningen, indeholdende den minimale koncentration af dextranet, der er nødvendigt for at sikre kontinuerlig stabilitet i den parenterale jernopløsning; molekulvægtsområdet vil således først i anden række vælges ud fra de fysiologiske virkninger af selve dextranen.

I den foreliggende sammenhæng forstås ved "grænseviskositets-tallet" grænseværdien for den specifikke viskositetsbrøk divideret med koncentrationen ved uendelig fortynding målt på følgende måde. "Flydetiden" af mindst tre opløsninger med forskellige koncentrationer (alle mindre end 5 vægtprocent dextran pr. volumen enhed) bestemmes i et Ost-

wald viskosimeter. Opløsningens flydetid divideret med vandets flydetid ved samme temperatur giver den viskositetsbrøk for forbindelsen ifølge opfindelsen ved given koncentration. Den specifikke viskositetsbrøk for forbindelsen ifølge opfindelsen ved en given koncentration opnås ved at trække 1,0 fra den fundne værdi for viskositetsbrøken. For hver koncentration af forbindelsen ifølge opfindelsen beregnes viskositetstallet (specifik viskositetsbrøk divideret med koncentration), og dette tal afsættes f. eks. som ordinat i et koordinatsystem med Koncentrationsprocenten for den tilsvarende opløsning som abscisse. Ved grafisk extrapolering til 0-koncentrationen findes grænseværdien for viskositetstallet (specifik viskositetsbrøk divideret med koncentration). Denne værdi kaldes grænseviskositetstallet for materialet i opløsningen. Som følge af, at de omtalte dextranfraktioner er polydisperse, anvendes udtrykket "gennemsnitligt grænseviskositetstal".

Det har vist sig, at stabile jernopløsninger kan fremstilles ud fra fraktioner af ferrihydroxidkomplekset af hydrogeneret dextran med grænseviskositetstal mellem 0,03 og 0,08. Jernindholdet af den ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede forbindelse ligger på mellem 3 og 7 vægtprocent jern (svarende til ca. 6 til 14 vægtprocent jernhydroxid). Nedbrydningsgraden for den hydrogenerede dextran må være således, at den får et gennemsnitligt grænseviskositetstal på 0,03 til 0,08.

I den ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede forbindelse forefindes colloidt ferrihydroxid. Det colloide ferrihydroxid kan dannes ved tilstedeværelse af den delvist depolymeriserede, hydrogenerede dextran ved opvarmning af et egned vandopløseligt ferrisalt og den fremstillede forbindelse i vandig opløsning med overskud af alkali, idet der herved sker en dobbelt dekomponeringsreaktion.

Som egnede ferriforbindelser kan anvendes 1) vandopløselige ferrisalte, så som chlorider, nitrater, sulfater eller acetater samt dobbeltsalte, så som ferriammoniumsulfat eller disse forbindelsers nærliggende kemiske økvivalenter, 2) ferrioxydsalte fremstillet ved opløsning af ferrihydroxid i en opløsning af et ferrisalt, dialyseret ferrisaltopløsning med stor renhed samt frisk bundfældede, udvaskede ferrihydroxider og endelig 3) en hvilken som helst ferriforbindelse, der efter at være blevet gjort alkalisk ved tilstedeværelse af hydrogeneret dextran giver anledning til fremkomst af ferrihydroxid.

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen anvendes som alkali almindeligvis natriumhydroxid, men der kan eventuelt anvendes andre egnede alkalier, såsom lithiumhydroxid, kaliumhydroxid, og ammoniumhydroxid samt carbonater af lithium, natrium og kalium.

Der kan ligeledes ifølge opfindelsen fremstilles stabile forbindelser, der kan anvendes i præparater til intramuskulær indgivelse ved anvendelse af ferricitrat, ferriammoniumcitrat eller ferriglycero-fosfat, men i disse tilfælde har det vist sig, at det er tvingende nødvendigt at anvende et kaustisk alkali, f. eks. natriumhydroxid, til at gøre blandingen alkalisk.

Det har endvidere vist sig, at de hidtil ukendte colloide ferrihydroxidkomplekser af hydrogeneret dextran kan renses for de samtidigt som biprodukter dannede elektrolyter ved anvendelse af en af følgende fremgangsmåder:

a) Ved at underkaste en forbindelse fremstillet ved anvendelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen en dialyse mod en vandstrøm, indtil det ønskede osmotiske tryk er opnået;

b) Ved at sammenblande en forbindelse fremstillet ved anvendelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen med et passende med vand blandbart opløsningsmiddel, såsom methylalkohol, ethylalkohol eller acetone, i en mængde, der er tilstrækkelig til at isolere colloïdet, hvorefter dette isoleres fra opløsningen og genopløses i destilleret vand til den ønskede koncentration.

Sterilisation af præparater fremstillet ved anvendelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen vil kunne foregå ved autoklavering af præparaterne i disses slutemballager, f. eks. i ampullerne, i 30 sekunder ved et damptryk på $0,7 \text{ kg/cm}^2$ svarende til en temperatur på 115°C . I modsætning til de colloide ferrihydroxid-dextrankomplekspræparater er de terapeutiske forbindelser fremstillet ved anvendelse af fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse meget modstandsdygtige over for ændringer i pH-værdien samt over for farveændringer og/eller afvigelser i klarhedsgraden som følge af autoklaveringen.

Når de colloide opløsninger, der fremstilles ved anvendelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen, dehydreres, f. eks. ved afdamping under formindsket tryk eller eventuelt ved isolering og efterfølgende tørring af det produkt, der fremkommer ved bundfældning af colloïdet ved tilsætning af et passende med vand blandbart opløsningsmiddel, såsom methylalkohol, ethylalkohol eller acetone, vil der fremkomme faste

forbindelser, der er egnede til øjeblikkelig gendannelse af colloide injicerbare opløsninger ved tilsætning af destilleret vand.

De terapeutiske forbindelser ifølge opfindelsen tilfredsstiller følgende krav, der må anses for at være ønskelige for en opløsning, der er beregnet til intramuskulær indgivelse ved behandling af jernmangel-anæmi:

- a) Ingen påvirkning af legemsvæskens pH-værdi,
- b) Isotonicitet med vævsvæsken,
- c) Stabilitet over for protein og elektrolyter,
- d) Let tilgængelig for hæmoglobinsynthese,
- e) Hurtig absorption i forbindelse med ringe udskillelseshastighed,
- f) Maksimalt jernindhold pr. minimal volumenenhed,
- g) Lav toxicitet,
- h) Reproducerbarhed,
- i) Stabilitet ved lagring.

Den hydrogenerede dextran, der anvendes til fremgangsmåden ved fremstilling af de terapeutiske forbindelser ifølge opfindelsen, har et gennemsnitligt grænseviskositetstal på mellem 0,03 og 0,08. Dette ligger under det gennemsnitlige grænseviskositetstal af de hydrogenerede dextraner, der findes anført i litteraturen.

Medens det tidligere har været foreslået at hydrogenerere dextraner med en gennemsnitlig molekylvægt på 75.000 eller gennemsnitlige molekylvægte mellem 50.000 og 100.000, ligger den optimale værdi for dextraner, der anvendes til fremstilling af hydrogenerede dextraner til brug ved fremstilling af de terapeutiske forbindelser ifølge den foreliggende opfindelse inden for et molekylvægtsinterval fra 2000 til ca. 10.000, nemlig med et gennemsnitligt grænseviskositetstal på 0,03 til 0,08. De hydrogenerede dextraner, der anvendes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, er i hovedsagen ikke reducerende over for Somogyi's reagens.

Fremstillingen af det som udgangsmateriale anvendte hydrogenerede dextran ved hydrogenering af fraktioner af syntetisk dextran belyses nærmere neden for.

Fremstilling af hydrogeneret dextran.

A. 200 g natriumborhydrid opløst i vand sattes til en 10% vandig opløsning indeholdende ca. 4,5 kg dextran med et gennemsnitligt grænseviskositetstal på 0,05. Blandingen henstod ved stuetemperatur i 5 timer med lejlighedsvis omrøring og blev derefter gjort sur ved til-

sætning af 30% eddikesyre. Den sure opløsning førtes gennem en cation-bytterharpikskolonne, og væskestrømmen herfra førtes gennem en anion-bytterharpikskolonne. Til den således deioniserede opløsning sattes methylalkohol under omrøring, hvorved der fremkom en opløsning indeholdende 60 volumenprocent methylalkohol. Efter henstand i 24 timer ved 25°C dekanteredes den ovenstående opløsning fra den bundfældede reducerede dextran. Produktet tørredes ved 100°C i vakuum i 2 timer. Produktet viste sig at være ikke-reducerende over for Somogyi's reagens. Det vil være hensigtsmæssigt, at der foretages en analyse med forskellige dextran-portioner til bestemmelse af tilstedeværelsen af en adækvat mængde natriumborhydrid i det ovennævnte eksempel, idet natriumborhydrid almindeligvis er til stede i et overskud ud over det, der minimalt kræves.

Der vil i stedet som udgangsmateriale kunne anvendes en syntetisk dextran med en molekylvægt på mellem ca. 2000 og ca. 20.000 og fortrinsvis på mellem 2000 og ca. 10.000, nemlig med et gennemsnitligt grænseviskositetstal på fra 0,03 til 0,08. Et sådant dextranprodukt fremstilles ved en kendt enzymatisk syntese-metode eller ved anvendelse af andre polymerisationsmetoder, der vil kunne benyttes til fremstilling af dextran svarende til det ovennævnte molekylvægtsinterval.

I tilfælde af, at der anvendes den kendte fremgangsmåde, har det vist sig hensigtsmæssigt til udøvelse af fremgangsmåden at anvende opløsninger med store saccharosekoncentrationer på 40 til 80 vægtprocent eller herover tilsat mindre mængder dextran med lav molekylvægt.

Nedenfor er under B beskrevet en polymerisationsproces til fremstilling af hydrogeneret dextran.

B. *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 anvendtes til fremstilling af dextransaccharose.

Denne dextransaccharose anvendtes til fremstilling af dextran ud fra en vandig blanding indeholdende 80 vægtprocent saccharose og 5 vægtprocent dextran med lav molekylvægt stammende fra en tidligere proces. pH-værdien af blandingen indstilles til 5,2, og temperaturen holdes på 25°C, indtil omdannelsen af saccharose til dextran var ophørt, hvilket måltes ved fructosedannelsen.

Dextranen bundfældedes herefter fra blandingen ved tilslætning af methylalkohol, hvorved der fremkom en 90% opløsning. Dette gummiagtige bundfald omdannedes til en 5% vandig opløsning og fraktionere-

des ved voksende tilsetning af methylalkohol, idet denne fraktionering omfattede fire trin, hvert bestående i en forøgelse af koncentrationen af methylalkohol, nemlig en methylalkohol-fraktionering svarende til 40-50, 50-60 og 60-70 volumenprocent. Dextranen fra slutfraktionen havde den rette molekylvægt til anvendelse ved fremstilling af ferrihydroxidkompleks af hydrogeneret dextran ifølge opfindelsen.

Dextranen fra den fjerde fraktion isoleredes og hydrogeneredes på følgende måde:

200 g natriumborhydrid opløst i vand sattes til en 10% vandig opløsning indeholdende ca. 4,5 kg af den nævnte dextran. Blandingen henstod ved stuetemperatur i 5 timer under lejlighedsvis omrøring og blev herefter gjort sur med 30% eddikesyre. Den sure blanding førtes gennem en cationbytterharpikskolonne, og væskestrømmen herfra førte igennem en anionbytterharpikskolonne.

Til den således deioniserede opløsning sattes under omrøring methylalkohol, hvorved der fremkom en opløsning indeholdende 60 volumenprocent methylalkohol. Efter henstand i 24 timer ved 25°C dekanteredes den ovenstående opløsning fra den bundfældede reducerede dextran. Produktet tørredes ved 100°C ved atmosfæretryk i 1 time og derefter ved 100°C i vakuum i 2 timer. Den fremkomne hydrogenerede dextran viste sig at være ikke-reducerende over for Somogyi's reagens.

De hydrogenerede dextraner, hvis fremstilling er anført ovenfor, er fuldstændig nye, hidtil ukendte kemiske forbindelser.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen vil i det følgende blive nærmere forklaret i forbindelse med eksempler.

Eksempel I

1,2 vægtdele ferrichlorid (beregnet i forhold til tør, hydrogeneret dextran) sattes til en vandig opløsning af 12 vægtprocent hydrogeneret dextran fremstillet som under A oven for med et gennemsnitligt grænseviskositetsstal ved 25°C på ca. 0,05. Efter at ferrichloridet var opløst, tilsatte langsamt under kraftig omrøring 5N vandig natriumhydroxid, indtil opløsningen havde en pH-værdi på 11,0. Opløsningen opvarmedes derefter til 95°C i 30 minutter, afkøledes til stuetemperatur og filtreredes. Det fremkomne ferrihydroxidkompleks af hydrogeneret dextran bundfældedes derefter med isopropylalkohol, idet det i denne sammenhæng skal anføres, at en hvilken som helst af de kendte bundfældningsmidler for dextran vil kunne anvendes, genopløstes i vand, og den ovennævnte bundfældning gentoges. pH-værdien indstilles herefter til 6,5 med 5N saltsyre. Ferrihydroxidkomplekset af den hydrogenerede dex-

tran bundfældedes fra den sure opløsning med isopropylalkohol. Bundfaldet af ferrihydroxidkomplekset af den hydrogenerede dextran opløstes herefter i vand til dannelse af en ca. 50 vægtprocents opløsning, og alkoholen bortkogtes.

Eksempel II

Der anvendtes den i eksempel I anførte fremgangsmåde med undtagelse af, at der i stedet for ferrichlorid anvendtes en ækvivalent mængde ferricitrat. Det viste sig, at reaktionen fuldendtes ved en temperatur på ca. 60°C i løbet af ca. 2 timer, medens der ved en temperatur på ca. 80°C krævedes ca. 45 minutter.

Eksempel III

1,2 vægtdele ferrichlorid beregnet i forhold til tør hydrogeneret dextran sattes til en opløsning af 12 vægtprocent hydrogeneret dextran med et gennemsnitligt grænseviskositetstal ved 25°C på ca. 0,05. Efter at ferrichloridet var opløst, tilsattes langsomt under kraftig omrøring 5N vandig natriumhydroxid, indtil opløsningen havde en pH-værdi på 11,0. Opløsningen opvarmedes derefter til 95°C i 30 minutter, afkøles til stuetemperatur og filtreredes. Den fremkomne ferrihydroxidkompleks af den hydrogenerede dextran bundfældedes med isopropylalkohol, idet det i denne forbindelse skal bemærkes, at der vil kunne anvendes et hvilket som helst af de kendte dextran-bundfældningsmidler, genopløstes i vand, og den ovennævnte bundfældning gentoges. pH-værdien indstilles herefter til 6,5 med 5N saltsyre. Forbindelsen bundfældedes fra den sure opløsning med isopropylalkohol.

Dette bundfald, der bestod af ferrihydroxidkompleks af hydrogeneret dextran, opløstes i vand til dannelse af en ca. 15 vægtprocent opløsning, og alkoholen bortkogtes.

Eksempel IV

Ved anvendelse af den i eksempel III angivne fremgangsmåde med undtagelse af, at der i stedet for ferrichlorid anvendtes en ækvivalent mængde ferricitrat, viste det sig, at reaktionen fuldendtes ved en temperatur på ca. 60°C i løbet af 2 timer, medens en temperatur på ca. 80°C krævede en reaktionstid på 45 minutter.

En sammenligning mellem det ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede ferrihydroxidkompleks af hydrogeneret dextran og den kendte ferrihydroxid-dextrankompleksforbindelse viser, at kompleksforbindelsen ifølge den foreliggende opfindelse har ikke-reducerende

virkning over for Somogyi's reagens i modsætning til den kendte kompleksforbindelse.

De terapeutiske præparater, der fremstilles ved anvendelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen, er i det væsentlige fri for jernioner og må derfor kunne betegnes som ikke-ioniske. Lagringsundersøgelser har vist, at disse præparater er meget stabile ved henstand, hvilket sandsynligvis skyldes de hydrogenerede carbonylgrupper, der ellers forefindes i ikke-hydrogeneret dextran inden for det omhandlede viskositetsområde.

P a t e n t k r a v:

1. Fremgangsmåde til fremstilling af et stabilt, i det væsentlige, ikke-ionisk, colloidt, ferrihydroxidkompleks af hydrogeneret dextran, kendte gennem, at en hydrogeneret dextran med en molekulvægt på mellem 2000 og 10.000 og et grænseviskositetstal på mellem 0,03 og 0,08, og som er fremkommet ved hydrogenering af fraktioner af syntetisk dextran, frembragt ved polymerisation af saccharose eller ved delvis depolymerisation af en mere højpolymer dextran, og som i det væsentlige ikke er reducerende over for Somogyi's reagens i nærværelse af vand bringes til at reagere med ferrihydroxid.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendte gennem, at det ved omsætning, anvendte ferrihydroxid dannes in situ ved omsætning mellem et ioniserbart ferrisalt og en alkalisk forbindelse.

Fremdragne publikationer: